

P24188.P07



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Yoo-Hun SUH et al.

Appln No. : 10/657,143

Group Art Unit: Unknown

Filed : September 9, 2003

Examiner: Unknown

For : COMPOSITION COMPRISING MINOCYCLINE AS AN EFFECTIVE  
COMPONENT FOR PREVENTION AND TREATMENT OF DEMENTIA,  
AND LEARNING AND MEMORY IMPAIRMENTS

**SUPPLEMENTAL CLAIM OF PRIORITY  
SUBMITTING CERTIFIED COPY**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

Further to the Claim of Priority filed September 9, 2003 and as required by 37 C.F.R. 1.55,  
Applicant hereby submits a certified copy of the application upon which the right of priority is  
granted pursuant to 35 U.S.C. §119, i.e., of Korean Application No.10-2002-0054650, filed  
September 10, 2002.

Respectfully submitted,  
Yoo-Hun SUH et al.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Bruce H. Bernstein".

Bruce H. Bernstein  
Reg. No. 29,027 33,094

March 30, 2004  
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.  
1950 Roland Clarke Place  
Reston, VA 20191  
(703) 716-1191



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0054650  
Application Number

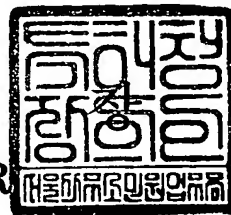
출원 년 월 일 : 2002년 09월 10일  
Date of Application SEP 10, 2002

출원인 : 주식회사 브레인트로피아  
Applicant(s) BRAINTROPIC CO., LTD.



2003      년      09      월      03      일

특      허      청  
COMMISSIONER



## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.09.10
【발명의 명칭】	미노사이클린을 유효성분으로 함유하는 치매 및 기억력 감퇴의 예방 및 치료용 조성물
【발명의 영문명칭】	Composition comprising minocycline as an effective component for prevention and treatment of dementia, and learning and memory impairments
【출원인】	
【명칭】	주식회사 브레인트로피아
【출원인코드】	1-2000-014844-3
【대리인】	
【성명】	박승문
【대리인코드】	9-1999-000536-0
【포괄위임등록번호】	2002-046649-8
【대리인】	
【성명】	조용식
【대리인코드】	9-1999-000634-5
【포괄위임등록번호】	2002-046650-1
【대리인】	
【성명】	안소영
【대리인코드】	9-2000-000155-5
【포괄위임등록번호】	2002-046653-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	서유헌
【성명의 영문표기】	SUH, Yoo Hun
【주민등록번호】	480208-1042022
【우편번호】	157-900
【주소】	서울특별시 강서구 화곡동 831-8
【국적】	KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 김혜선  
**【성명의 영문표기】** KIM,Hye Sun  
**【주민등록번호】** 580713-2041313  
**【우편번호】** 158-774  
**【주소】** 서울특별시 양천구 신정동 목동아파트1408동 706호  
**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 박철형  
**【성명의 영문표기】** PARK,Cheol Hyung  
**【주민등록번호】** 630301-1466330  
**【우편번호】** 135-778  
**【주소】** 서울특별시 강남구 대치2동 은마아파트 3-1312  
**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 김은미  
**【성명의 영문표기】** KIM,Eun Mee  
**【주민등록번호】** 770914-2822216  
**【우편번호】** 137-949  
**【주소】** 서울특별시 서초구 잠원동70 신반포4차아파트 203동 1204호  
**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 신기영  
**【성명의 영문표기】** SHIN,KI Young  
**【주민등록번호】** 740902-1559022  
**【우편번호】** 503-827  
**【주소】** 광주광역시 남구 월산4동 971-14  
**【국적】** KR

**【심사청구】** 청구**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**

**【서열개수】** 10  
**【서열목록의 전자문서】** 첨부

## 【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인

박승문 (인) 대리인

조용식 (인) 대리인

안소영 (인)

## 【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 10 면 10,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 14 항 557,000 원

【합계】 596,000 원

【감면사유】 소기업 (70%감면)

【감면후 수수료】 178,800 원

## 【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)\_1통 2. 소기업임을 증명하는  
서류[사업자등록증, 원천징수이행상황신고서]\_ 1통

**【요약서】**

**【요약】**

본 발명은 미노사이클린을 유효성분으로 함유하는 치매 및 기억력 감퇴의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 아밀로이드 베타 단백질 또는 C단 단백질의 독성에 의해 유발되는 뇌세포 사멸 및 기억력 감퇴를 억제하는 효과가 있다.

따라서, 본 발명의 조성물은 알츠하이머성 치매를 비롯한 각종 치매 및 기억력의 감퇴로 인한 학습인지기능 장애의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

**【대표도】**

도 1

**【명세서】****【발명의 명칭】**

미노사이클린을 유효성분으로 함유하는 치매 및 기억력 감퇴의 예방 및 치료용 조성물 {Composition comprising minocycline as an effective component for prevention and treatment of dementia, and learning and memory impairments}

**【도면의 간단한 설명】**

도 1은 본 발명의 조성물이 세포 외부에서 처리된 아밀로이드 베타 단백질에 의한 뇌세포 독성 효과를 억제할 수 있음을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 조성물이 세포 내부에서 생성된 아밀로이드 베타 단백질에 의한 뇌세포 독성 효과를 억제할 수 있음을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 조성물이 세포 내부에서 생성된 C단 단백질에 의한 뇌세포 독성 효과를 억제할 수 있음을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 조성물이 C단 단백질에 의해 유도된 치매동물모델에서 단순기억력의 감퇴를 회복시킬 수 있음을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 조성물이 C단 단백질에 의해 유도된 치매동물모델에서 공간기억력의 감퇴를 회복시킬 수 있음을 나타낸 도이다.

**【발명의 상세한 설명】****【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <6> 본 발명은 미노사이클린(minocycline)을 유효성분으로 함유하는 치매 및 기억력 감퇴의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.
- <7> 치매(dementia)란 뇌세포 사멸 및 기억력 감퇴 등 뇌기능의 전반적인 장애가 나타나는 것을 특징으로 하는 퇴행성 질환으로, 65세 이상인 사람들의 약 10%, 80세 이상의 노인들의 약 50% 이상에서 나타나는 것으로 추정된다. 최근 노령화 인구가 증가하게 되면서 그 발병속도는 더욱 급속하게 증가할 것으로 예상되므로, 치매는 현대사회의 심각한 사회적, 경제적 문제로 대두되고 있다.
- <8> 치매의 원인은 다양해서 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease), 혈관성 치매, 기타 알콜 중독, 외상, 파킨슨병의 후유증으로 오는 치매로 구분된다. 치매 환자의 절반 이상에서 알츠하이머성 치매가 나타나고 있기 때문에, 치매에 대한 연구는 알츠하이머성 치매를 중점으로 하여 진행되고 있다.
- <9> 알츠하이머성 치매의 발병기전은 명확하게 밝혀져 있지 않으나, 현재까지는 중추신경계에서 아세틸콜린 기능의 감소, 아밀로이드 베타(amyloid beta, A $\beta$ ) 단백질을 주성분으로 하는 노인반(senile plaque)의 뇌세포 내 침착, 또는 세포 외부의 과산화탄화된 타우 단백질을 주성분으로 하는 신경섬유덩어리(Neurofibrillary tangle)의 출현 등과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.



- <10>        기존에는 상기 원인 중 콜린성 신경계의 기능 저하와 기억력 저하 사이의 상관관계를 밝혀주는 연구결과가 많이 보고되었으므로, 콜린 신경계를 보충하고 개선함으로써 치매를 치료하고자 하는 노력이 계속되어 왔다.
- <11>        따라서 기존의 치매 치료제는 뇌에서 아세틸콜린의 분해효소인 아세틸콜린 에스테라제(AchE)의 활성을 억제할 수 있는 아세틸콜린분해 억제제 (Acetylcholinesterase inhibitor), 또는 아세틸콜린의 농도를 일정수준으로 유지해 줄 수 있는 아세틸콜린 합성전구체(acetylcholine precursor) 및 아세틸콜린 수용체 활성화제(Receptor agonist) 등의 물질들이 대부분이다.
- <12>        그 예로, 아세틸콜린분해 억제제로는 FDA의 승인을 받아 국내에서도 시판사 용중인 타크린(tacrine), 아리셉트(aricept) 및 갈란타민(galantamine), 아세틸콜린 합성전구체로는 레시틴(lecitin), 그리고 아세틸콜린 수용체 활성화제로는 RS-86, 니코틴(nicotine) 등이 있다.
- <13>        그러나 치매가 진행되면서 아세틸콜린성 신경세포 뿐 아니라 신경세포의 대다수를 차지하는 글루탐산성 신경세포들도 퇴화하기 때문에, 아세틸콜린의 활성 증진에 중점을 둔 상기 방법은 일시적이고 미약한 치매 예방 및 치료효과만을 거둘 뿐이다.
- <14>        또한 타크린을 비롯한 대부분의 약물들은 심각한 간독성, 구토, 오심 또는 설사 등의 부작용 때문에 아직까지 그 사용여부에 대해 논란의 여지가 많은 상태이다.

- <15> 최근에는 이미 치매유발인자로 공지된 아밀로이드 베타 단백질과 더불어, 아밀로이드 전구 단백질의 C말단 부위로 이루어지는 C단(端) 단백질이 아밀로이드 베타 단백질보다 더 강한 독성을 나타내면서 치매의 주요한 발병 원인으로 작용한다는 연구결과들이 보고되고 있다.
- <16> 이러한 점에 착안하여, 이들 단백질의 생성 및 이들이 나타내는 뇌세포 독성 효과를 억제할 수 있는 약물, 예를 들면 독성 아밀로이드 단백질 생성억제제, 정상대사 촉진제 및 독성 아밀로이드 단백질 침착억제제 등이 개발 중에 있다.
- <17> 그러나, 아직까지 뚜렷한 효과를 나타내는 물질은 보고되지 않았으며, 그나마 임상적용되었던 아밀로이드 베타 단백질 면역요법의 경우, 중추신경계에 염증 반응이 나타나는 부작용 때문에 더이상의 사용이 중단된 상태이다.
- <18> 따라서 별도의 부작용없이 효과적으로 치매 및 기억력 감퇴를 예방 및 치료할 수 있는 약물에 대한 발명이 시급하다.
- <19> 한편, 테트라사이클린(tetracycline)계 항생물질인 미노사이클린은, 광범위한 종류의 세균, 바이러스 및 원충류에 대해 우수한 효과를 나타내며, 사람에게 장기간 사용하여도 부작용이 없어 안정성이 확인된 약물로 알려져 있다.
- <20> 최근 들어 미노사이클린이 신경퇴행성 질환인 헌팅턴병(Huntington disease), 근위축성측삭경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis), 파킨슨씨병(Parkinson disease)의 동물모델에서 비정상적인 단백질 대사를 촉진하는 단백질 소인 캐스페이즈-1(caspase-1), 캐스페이즈-3(caspase-3)의 발현 및 활성을 억제

하고, 세포 고사 신호전달에 기여하여 세포 사멸을 유도하는 p38 MAPK의 활성을 억제함으로써, 이들 질환을 둔화시키는 또다른 효과가 있음이 입증되었다.

<21> 본 발명자들은 미노사이클린이 알츠하이머성 치매를 비롯한 각종 치매 및 기억력 감퇴를 예방 또는 치료하는 효과를 지니고 있음에 착안하여, 본 발명을 완성하였다.

**【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】**

<22> 본 발명에서는 미노사이클린을 유효성분으로 함유하며, 뇌세포 사멸 및 기억력 감퇴에 대해 억제 효과를 나타내는 치매 및 기억력 감퇴의 예방 및 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

**【발명의 구성 및 작용】**

<23> 본 발명은 미노사이클린을 유효성분으로 함유하는 치매 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

<24> 또한 본 발명에서는 미노사이클린을 유효성분으로 함유하는 기억력 감퇴의 예방 및 치료용 억제학적 조성물을 제공한다.

<25> 본 발명의 조성물은 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유발되는 뇌세포 독성을 억제한다. 또한 본 발명의 조성물은 C단 단백질에 의해 유발되는 뇌세포 독성을 억제한다. 따라서 본 발명의 조성물은 치매의 주증상인 뇌세포 사멸을 억제할 수 있다.

<26> 본 발명의 조성물은 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유발되는 기억력 감퇴를 억제한다. 또한 본 발명의 조성물은 C단 단백질에 의해 유발되는 기억력 감퇴

를 억제한다. 따라서 본 발명의 조성물은 치매의 주증상인 기억력의 감퇴와 그로 인한 학습인지기능의 장애를 억제할 수 있다.

<27> 뇌세포 사멸 및 기억력의 감퇴는 특히 알츠하이머성 치매에서 나타나는 주 증상이므로, 본 발명의 조성물은 치매 중에서도 알츠하이머성 치매의 예방 및 치료에 더욱 유용하게 사용될 수 있다.

<28> 본 발명의 조성물에서 미노사이클린은 생리적 완충액으로 사용되는 용액에 적절한 농도로 녹여 사용한다.

<29> 본 발명의 조성물은 유효성분으로 미노사이클린 뿐 아니라 이와 동일 또는 유사한 기능을 지닌 성분을 함께 함유할 수 있으며, 필요에 따라 다른 유효성분을 추가로 함유할 수 있다.

<30> 본 발명의 조성물은 독성 시험 결과 생체에 별다른 부작용을 미치지 않는 것으로 판명되었다.

<31> 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에, 약제학적으로 적합하며 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 용매, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 운활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.

<32> 본 발명의 조성물 중 약제학적 조성물은 투여를 위해 상기 기재한 유효성분 이외에, 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 추가로 포함하여 제제화할 수 있다.

<33> 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 하나 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당분야의 적절한 방법으로, 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라, 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

<34> 본 발명의 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

<35> 본 발명의 약제학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

<36> 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 성인 1일 100~200mg의 범위 내에서 조절하는 것이 바람직하며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

<37> 본 발명의 약제학적 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병행하여 사용할 수 있다.

<38> 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명하되, 본 발명의 범위가 다음의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<39> [실시예 1] 본 발명의 조성물이 세포 외부에 처리한 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유발되는 뇌세포 사멸에 미치는 효과

<40> 본 발명의 조성물이 세포 외부에 처리한 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유발되는 뇌세포 사멸에 미치는 효과를 다음과 같이 확인하였다.

<41> 1) 본 발명의 조성물 제조

<42> 본 발명의 조성물은 미노사이클린을 PBS 완충액(pH 7.4)에 10mM의 농도가 되도록 녹인 용액으로 준비하였다.

<43> 2) 아밀로이드 베타 단백질의 준비

<44> 세포의 외부에 처리할 아밀로이드 베타 단백질은 유에스펩티드사(U.S. Peptide Inc.)의 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 단백질을 구입하여 준비하였다.

<45> 3) 세포 배양

<46> 신경세포 모델로 사용될 세포는 흰쥐 갈색세포종에서 기원한 PC12 세포를 선택하였다. 상기 세포는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum) 및 1% 항생제를 함유하는 DMEM 배지에서 배양하였으며, 실험에 사용하기 이를 전에 50ng/ml의

NGF(nerve growth factor;Sigma)를 저혈청(0.3%) 배지에 첨가하여 배지를 교체함으로써 신경세포로 분화시켰다.

<47>       상기와 같이 준비된 PC12 세포에 본 발명의 조성물을 10  $\mu$ M의 농도가 되도록 처리하고, 24시간 후 아밀로이드 베타 단백질 A $\beta$ <sub>1-42</sub>을 30  $\mu$ M의 농도가 되도록 처리한 후, 다시 24시간 동안 배양하였다. 이때 PBS만 처리한 대조군, 본 발명의 조성물만 처리한 군, 아밀로이드 베타 단백질 A $\beta$ <sub>1-42</sub>만을 처리한 군도 함께 준비하여, 이후의 세포독성실험에 사용하였다.

<48>       4) 세포독성실험 - 1 : MTT 분석

<49>       MTT 분석을 위해, 배양된 세포에 30  $\mu$ M의 A $\beta$ 를 첨가하고 5% CO<sub>2</sub>, 37℃의 조건에서 배양하였다. 24시간 후에 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma 사) 용액을 최종농도 0.5 mg/ml이 되도록 각 웰에 첨가한 후, 4시간 30분 동안 배양하였다. MTT의 환원에 의해서 형성된 포마잔 침전(formazan precipitate)을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹인 후, ELISA 기기를 이용하여 570nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 시료에 대한 세포 독성 측정 결과는 용매만을 추가하여 측정한 음성 대조군에서 측정된 흡광도를 100 %로 하고, 0.9% Triton X-100에 의해 세포가 완전히 파괴된 양성 대조군에서 측정된 흡광도를 0%로 하여 상대적인 값으로 계산하였다. 이경우 MTT 환원 정도가 낮을수록 세포 활성도는 낮다.

<50>       상기와 같이 MTT 환원 정도를 측정함으로써 각 군의 세포활성도(cell viability)를 얻고, 그 결과를 도 1a에 나타내었다.

<51> 도 1a에 나타난 바와 같이, MTT 분석 결과 뇌세포 활성도는 외부 처리된 아밀로이드 베타 단백질  $A\beta_{1-42}$ 에 의해 유의하게 감소하였으나(3번째, \*로 표시), 본 발명의 조성물을 전처리한 경우에는 세포활성도가 현저하게 회복되었다(4번째).

<52> 5) 세포독성실험 - 2 : LDH 분석

<53> LDH 분석은 세포막이 깨지면서 배지로 분비되어 나온 LDH(lactate dehydrogenase) 양을 측정하는 방법으로, 사이토독스 96 분석키트(CytoTox 96 assay kit, Promega)를 이용하여 측정하였다. 배양된 세포에 해당 농도의 펩티드를 첨가한 뒤 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 50ml씩 수집한 후, 각 웰에 NAD<sup>+</sup>와 테트라졸륨염(tetrazolium salt)으로 이루어진 기질 혼합체(substrate mix)를 50ml씩 추가하고, 30분간 암실에서 반응시켰다. LDH에 의해 형성된 포마잔에 의해서 붉은 색이 발현되면, 반응중지액(stop solution)을 첨가하여 반응을 중지시키고, ELISA 기기를 이용하여 490nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 군의 LDH 값은 0.9% Triton X-100을 이용하여 세포를 완전히 용해시켰을 때 유리되는 LDH 값을 100%로 하여 상대적인 값으로 계산하였다. 이 경우 LDH 분비 정도가 높을수록 세포 활성도는 낮다.

<54> 상기와 같이 LDH 분비 정도를 측정함으로써 각 군의 세포활성도(cell viability)를 얻고, 그 결과를 도 1b에 나타내었다.

<55> 도 1b에 나타난 바와 같이, LDH 분석 결과 뇌세포 활성도는 외부 처리된 아밀로이드 베타 단백질  $A\beta_{1-42}$ 에 의해 유의하게 감소하였으나(3번째, \*로 표시),



본 발명의 조성물을 전처리한 경우에는 세포활성도가 현저하게 회복되었다(4번째).

<56>        6) 결론

<57>        상기 MTT 분석 및 LDH 분석 결과로부터, 본 발명의 조성물은 외부 처리된 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유발되는 뇌세포 사멸을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

<58>        [실시예 2] 본 발명의 조성물이 세포 내에서 생성된 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유발되는 뇌세포 사멸에 미치는 효과

<59>        본 발명의 조성물이 세포 내에서 생성된 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유발되는 뇌세포 사멸에 미치는 효과를 다음과 같이 확인하였다.

<60>        1) 본 발명의 조성물 제조

<61>        본 발명의 조성물은 실시예 1의 1)과 마찬가지로의 방법에 따라 준비하였다.

<62>        2) 아밀로이드 베타 단백질 발현 세포의 제조

<63>        아밀로이드 베타 단백질 발현 세포의 제조를 위해, 아밀로이드 전구단백질의 야생형 단백질(wild type, 이하 'WT'라 한다) 및 아밀로이드 전구단백질의 스웨디쉬 돌연변이 단백질(swedish mutant, 이하 'swe'라 한다)을 발현할 수 있는 재조합 벡터를 제조하였다. 스웨디쉬 돌연변이 단백질은 조기 치매 증상을 보이는 환자의 뇌에서 많이 검출되는 것으로 알려져 있다.

<64> 각 단백질의 유전자를 암호화하는 염기서열을 얻기 위해, 아밀로이드 전구 단백질을 주형으로 하는 PCR에 사용될 프라이머들을 하기 표 1과 같이 제작하였다.

<65> 【표 1】

목적 단백질	방향	염기서열	염기서열번호
WT	정방향	5'- AGTTTCCTCGGCAGCGGTAGGCGAGA - 3'	서열번호 1
	역방향	5'- GTTCTGCATCTGCTCAAAGAACTTGTA - 3'	서열번호 2
swe	정방향	5'- AGTTTCCTCGGCAGCGGTAGGCGAGA - 3'	서열번호 3
	역방향	5'- GTTCTGCATCTGCTCAAAGAACTTGTA - 3'	서열번호 4

<66> 상기 프라이머들을 이용하여 PCR을 수행한 후, 그 결과 얻은 증폭된 DNA를 아가로스 겔 전기영동(agarose gel electrophoresis)하고 밴드 크기를 비교하여, 원하는 유전자가 제대로 얻어졌는지를 확인하였다.

<67> 상기 PCR 산물들을 T7 프로모터를 지니며 myc 융합 단백질을 생산할 수 있는 진핵세포 발현벡터 pCB6에 각각 삽입하여, 재조합 플라스미드들을 제조하였다.

<68> 상기 재조합 플라스미드들을 이용한 형질도입에 사용될 세포는, 실시예 1의 3)과 마찬가지로의 방법에 따라 배양하였다. 24시간 후 상기에서 제조한 재조합 플라스미드들을 각각 2 $\mu$ g씩 형질도입시약(transfection reagent; Fugene 6, BM) 3  $\mu$ l이 함유된 배지 100 $\mu$ l에 첨가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후, 세포의 배양액 위에 한 방울씩 천천히 떨어뜨리고 5% CO<sub>2</sub>, 37℃의 조건에서 배양하였다. 이

때 아무것도 처리하지 않고 형질도입도 수행하지 않은 대조군, 본 발명의 조성물만 처리한 군, 형질도입만 수행한 군도 함께 준비하였다.

<69> 형질도입한지 6시간 후 배양액을 제거하여 새 배양액으로 교체한 후, 본 발명의 조성물을 10  $\mu$ M의 농도가 되도록 처리하고, 다시 24~48 시간 동안 배양한 후 세포를 수집하여 이후의 세포독성실험에 사용하였다.

<70> 3) 세포독성실험 - 1 : MTT 분석

<71> 수집된 각 군의 세포에 대해 상기 실시예 1의 4)과 마찬가지로의 방법에 따라 MTT 환원 정도를 측정하고, 그 결과 얻은 세포활성도를 도 2a에 나타내었다.

<72> 도 2a에서, 공지된 바와 같이 내부 생성된 아밀로이드 전구단백질은 세포활성도에 별다른 영향을 미치지 않았으며(3번째), 내부 생성된 아밀로이드 베타 단백질 swe는 세포활성도를 유의한 수준으로 감소시켰다(5번째, \*로 표시). 반면 swe 단백질이 내부 생성되기 전에 미노사이클린을 전처리한 군에서는, 세포활성도를 현저하게 회복시켰다(6번째).

<73> 4) 세포독성실험 - 2 : LDH 분석

<74> 수집된 각 군의 세포에 대해 상기 실시예 1의 5)과 마찬가지로의 방법에 따라 LDH 분비 정도를 측정하고, 그 결과 얻은 세포활성도를 도 2b에 나타내었다.

<75> 도 2b에서, 공지된 바와 같이 내부 생성된 아밀로이드 전구단백질은 세포활성도에 별다른 영향을 미치지 않았으며(3번째), 내부 생성된 아밀로이드 베타 단백질 swe는 세포활성도를 유의한 수준으로 감소시켰다(5번째, \*로 표시). 반면

swe 단백질이 내부 생성되기 전에 미노사이클린을 전처리한 군에서는, 세포활성도를 현저하게 회복시켰다(6번째).

<76> 5) 결론

<77> 상기 MTT 분석 및 LDH 분석 결과로부터, 본 발명의 조성물은 내부 생성된 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유발되는 뇌세포 사멸을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

<78> [실시예 3] 본 발명의 조성물이 세포 내에서 생성된 C단 단백질에 의해 유발되는 뇌세포 사멸에 미치는 효과

<79> 본 발명의 조성물이 세포 내에서 생성된 C단 단백질에 의해 유발되는 뇌세포 사멸에 미치는 효과를 다음과 같이 확인하였다.

<80> 1) 본 발명의 조성물 제조

<81> 본 발명의 조성물은 실시예 1의 1)과 마찬가지로의 방법에 따라 준비하였다.

<82> 2) C단 단백질 발현 세포의 제조

<83> C단 단백질 발현 세포의 제조를 위해, 아밀로이드 전구단백질의 C단 쪽의 59개의 아미노산으로 구성된 단백질(이하 'C59'라 한다) 및 아밀로이드 전구단백질의 C단 쪽의 99개의 아미노산으로 구성된 단백질(이하 'C99'라 한다)을 발현할 수 있는 재조합 벡터를 제조하였다.

<84> 각 단백질의 유전자를 암호화하는 염기서열을 얻기 위해, 아밀로이드 전구 단백질을 주형으로 하는 PCR에 사용될 프라이머들을 하기 표 2과 같이 제작하였다.

<85> 【표 2】

목적 단백질	방향	염기서열	염기서열번호
C59	정방향	5'- ATAGCGACAGTGATCGTCATCACCTTG - 3'	서열번호 5
	역방향	5'- GTTCTGCATCTGCTCAAAGAACTTGTA - 3'	서열번호 6
C99	정방향	5'- GATGCAGAATTCGGACATGACTGAGGA - 3'	서열번호 7
	역방향	5'- GTTCTGCATCTGCTCAAAGAACTTGTA - 3'	서열번호 8

<86> 상기 프라이머들을 이용하여 PCR을 수행한 후, 그 결과 얻은 증폭된 DNA를 아가로스 겔 전기영동하고 밴드 크기를 비교하여, 원하는 유전자가 제대로 얻어졌는지를 확인하였다.

<87> 상기 PCR 산물들을 T7 프로모터를 지니며 myc 융합 단백질을 생산할 수 있는 진핵세포 발현벡터 pEGFP-N1에 각각 삽입하여, 재조합 플라스미드들을 제조하였다.

<88> 이후, 상기 재조합 플라스미드들을 이용한 형질도입 및 세포 수집은 실시예 2의 2)와 마찬가지로의 방법에 따라 수행하였다.

### <89> 3) 세포독성실험 - 1 : MTT 분석

<90> 수집된 각 군의 세포에 대해 상기 실시예 1의 4)과 마찬가지로의 방법에 따라 MTT 환원 정도를 측정하고, 그 결과 얻은 세포활성도를 도 3a에 나타내었다.

<91> 도 3a에 나타난 바와 같이, 내부 생성된 C59와 C99 등 C단 단백질은 뇌세포 활성도를 유의하게 감소시켰으나(3번째, 5번째, 각각 \*로 표시), 이러한 세포사멸효과는 미노사이클린의 전처리에 의하여 크게 감소하였다(4번째, 6번째).

<92> 4) 세포독성실험 - 2 : LDH 분석

<93> 수집된 각 군의 세포에 대해 상기 실시예 1의 5)과 마찬가지로의 방법에 따라 LDH 분비 정도를 측정하고, 그 결과 얻은 세포활성도를 도 3b에 나타내었다.

<94> 도 3b에 나타난 바와 같이, 내부 생성된 C59와 C99 등 C단 단백질은 뇌세포 활성도를 유의하게 감소시켰으나(3번째, 5번째, 각각 \*로 표시), 이러한 세포사멸효과는 미노사이클린의 전처리에 의하여 크게 감소하였다(4번째, 6번째).

<95> 5) 결론

<96> 상기 MTT 분석 및 LDH 분석 결과로부터, 본 발명의 조성물은 내부 생성된 C단 단백질에 의해 유발되는 뇌세포 사멸을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

<97> [실시예 4] 본 발명의 조성물이 C단 단백질에 의해 유발되는 단순기억력 감퇴에 미치는 효과

<98> 본 발명의 조성물이 C단 단백질에 의해 유발되는 단순기억력 감퇴에 미치는 효과를 다음과 같이 확인하였다.

<99> 1) 본 발명의 조성물 제조

<100> 본 발명의 조성물은 미노사이클린을 PBS 완충액(pH 7.4)에 5mg/ml의 농도가 되도록 녹인 용액으로 준비하였다.

<101> 2) C단 단백질의 제조

<102> 치매유도에 사용될 C단 단백질은 아밀로이드 전구단백질의 C단 부분의 105개 아미노산으로 구성되는 단백질(이하 'CT105'라 한다)을 사용하기로 하고, PCR을 수행하여 원하는 유전자를 얻었다. 이때 사용된 프라이머의 염기서열은 다음과 같다.

<103> 정방향: 5'- ATCTCTGAAGTGAAGATGGATGCAGAA -3' (서열번호 9)

<104> 역방향: 5'- GTTCTGCATCTGCTCAAAGAACTTGTA -3' (서열번호 10)

<105> 상기와 같이 하여 얻은 유전자를 Trp 프로모터를 지니는 원핵세포 발현벡터인 pGEX4T-1에 삽입하여 클로닝하였다.

<106> 그 결과 얻은 재조합 플라스미드들을 이용하여 대장균을 형질전환시키고 (Hanahan), 단백질 발현 여부를 확인하기 위해 고형 배지 상에 나타난 콜로니를 이용하여 새로 하룻밤동안 증배양한 후, M9 발현배지에 접종하여 본배양을 수행하였다. 600nm에서의 흡광도가 0.5~0.8 정도 될 때, PTG(isopropyl-thiogalactoside)를 최종 1mM 농도로 가하여 단백질 발현을 유도하였다. 이렇게 하여 얻어진 배양세포로부터 단백질을 얻고, SDS-PAGE 분석을 Lammeli 방법(1970)에 따라 수행하여, 재조합 단백질의 발현 여부를 확인하였다.

<107> 세포배양액으로부터 세포를 침전시켜 STET 완충액에 현탁시킨 후, 리소자임(lysozyme)으로 일정시간 처리하였다. 초음파처리기(sonicator)로 세포

들을 파쇄한 후, 약 6000rpm에서 원심분리하여 불용해성 침전물(insoluble pellet)을 얻었다. 이들을 NTE 완충액으로 세척한 후, 발현량의 정도에 따라 정제과정을 설정하며 순차적 2M-4M-8M 유레아 추출법을 수행하여 단백질을 부분 정제하였다.

<108> 융합되지 않은 재조합 단백질들은, 젤 여과(gel filtration), 이온교환크로마토그래피(ion exchange chromatography, DEAE-sepharose-C1-6B) 및 전기용출법(electroelution) 등의 방법을 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질에 대해 융합 파트너(fusion partner)들을 절단시켜, 치매 유도에 사용될 순수한 재조합 단백질만을 얻었다.

### <109> 3) 실험동물의 사육

<110> 치매유도 동물모델로 사용될 동물로 체중 18~26g의 수컷 ICR 마우스를 선택하여, 실험기간 내내 실내온도가 25±1℃로 유지되고, 12시간씩 낮과 밤이 자동으로 부여되는 환경에서 사육하였다.

<111> 기억력 평가실험 전, 미노사이클린의 투여량이 10mg/kg가 되도록 하여 상기에서 제조한 본 발명의 조성물을 마우스의 복강 내로 1주일간 1일 1회씩 투여하였다. 이때 본 발명의 조성물을 전투여하지 않은 군도 같은 조건에서 사육하였다.

### <112> 4) 수동회피반응 측정을 통한 단순기억능력 평가

<113> 수동회피반응 측정을 통해, 본 발명의 조성물이 투여되거나 또는 투여되지 않은 마우스를 학습시킨 후, 치매 유도 후의 단순기억력을 평가하였다.



<114> 실험기구로 자동화된 셔틀 상자(shuttle box, Model PACS-30, Columbus Instruments International Company)를 이용하였다. 상기 셔틀 상자는 칸막이문(길이 3cm ×너비 2.625cm)에 의하여 같은 크기(길이 19cm ×너비 9cm ×높이 10.875 cm)의 두 개의 방으로 분리되어 있고, 방바닥에는 전류가 흐를 수 있게 장치되어 있으며, 각 방은 20W 전구에 의해 조명되도록 하였다. 따라서, 상자에 넣어진 마우스는 칸막이 문을 통하여 밝은 방에서 어두운 방으로 건너갈 수 있다.

<115> 소음이 60dB 이하로 유지되고, 조명을 어둡게 한 방에 상기 셔틀 상자를 위치시켰다. 셔틀 상자의 한쪽 방에 불을 켜 주고 백서를 투입한 후, 백서가 칸막이 문을 통해 불이 꺼진 방으로 넘어가면 칸막이 문이 자동으로 닫히도록 하였다. 이때 백서가 불이 켜진 방에서 불이 꺼진 방으로 넘어가기까지 소요되는 시간을 도달시간(latency time)으로 하여, 이후의 기억력 평가의 지표로 삼았다. 상기 과정을 반복하여 백서가 20초 이내에 불이 켜진 방에서 불이 꺼진 방으로 건너갈 수 있도록 학습시킨 후, 24시간 후 다시 백서를 불을 켜 준 방에 투입하였다. 이때 백서가 불이 꺼진 방으로 들어가게 되면, 칸막이 문이 닫히면서 바닥에 3초 동안 1mA의 전류가 흐르게 하였다.

<116> 상기와 같이 학습을 수행하고, 30분 후 상기 실시예 4의 2)에서 제조한 CT105 단백질을 0.1M PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4)에 녹이고, 투여 용량을 685 pmol/5ml로 하여 실험대상 마우스의 대뇌실 내로 해밀톤 주사기를 이용하여 투여하였다. 이때 아무것도 투여하지 않은 대조군과, 미노사이클린의 전처치 없이 CT105 단백질만을 투여하여 치매를 유도한 비교군도 함께 준비하였다.

<117> 1주일 후, 다시 각 군의 마우스들을 서틀 상자에 투입하여 밝은 방에서 어두운 방으로 넘어갈 때까지의 시간을 측정하였다. 도달시간의 변화는 기억력의 감퇴와 회복을 나타내며, 도달시간이 길어질수록 기억력이 상승되었음을 의미한다. 최대도달시간은 5분으로 정하고, 각각의 실험을 3회 이상 독립적으로 실시하였으며, 분산분석법(analysis of variance, ANOVA) 또는 스튜던트 t-분석법(student t-test)을 이용하여 통계적 유의성을 검증하고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

<118> 도 4에 나타난 바와 같이, CT105 단백질을 대뇌실에 주사한 마우스들의 도달시간은 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다(두번째, \*로 표시). 이는 CT105 단백질의 침착으로 인해 치매가 유발되어 단순기억력이 감퇴되었기 때문이다.

<119> 그러나 본 발명의 조성물을 전처치한 후 CT105 단백질을 투여한 군에서는, CT105단백질만을 투여한 군에 비해 도달시간이 유의하게 회복되었다(세번째, \*\*로 표시).

<120> 5) 결론

<121> 상기 수동회피반응 측정을 통해, 본 발명의 조성물은 아밀로이드 전구단백질의 C단 부분 단백질에 의해 유발되는 단순기억력의 감퇴를 예방할 수 있음을 알 수 있다.

<122> [실시예 5] 본 발명의 조성물이 C단 단백질에 의해 유발되는 공간기억력 감퇴에 미치는 효과

<123> 본 발명의 조성물이 C단 단백질에 의해 유발되는 공간기억력 감퇴에 미치는 효과를 다음과 같이 확인하였다.

<124> 1) 본 발명의 조성물 제조

<125> 본 발명의 조성물은 상기 실시예 4의 1)과 마찬가지로의 방법에 따라 제조하였다.

<126> 2) C단 단백질의 제조

<127> 치매유도에 사용될 C단 단백질은 상기 실시예 4의 2)과 마찬가지로의 방법에 따라 제조하였다.

<128> 3) 실험동물사육

<129> 치매유도 동물모델로 사용될 동물은 상기 실시예 4의 3)과 마찬가지로의 방법에 따라 사육하고, 미노사이클린을 전처치하였다. 미노사이클린 전처치 후, 실시예 4의 4)와 마찬가지로의 방법에 따라 각 군에 C단 단백질을 처리하였다. 이때 아무것도 처리하지 않은 대조군 및 C단 단백질만을 투여한 비교군도 함께 준비하였다.

<130> 4) 수중미로측정(Water maze test)을 통한 공간기억력 평가

<131> 수중미로측정을 통해, 본 발명의 조성물이 투여되거나 또는 투여되지 않은 마우스에서 치매 유도 후 공간기억력을 평가하였다.

<132> 원형물탱크(지름 140cm ×높이 45cm)에 물을 채운 후, 우유를 넣어 불투명하게 만들었다. 원형물탱크 내부를 임의로 네 구역을 나눈 후, 한 구역에 안전판(지름 15cm ×높이 35cm)을 수면 아래 약 1.5cm가 되도록 설치하여 보이지 않도록 하였다.

<133> 상기에서 준비한 각 군에 대해, 안전판과 가장 먼 쪽의 한 부분을 출발점으로 하여 마우스를 원형물탱크에 투입시키면, 마우스가 수영을 하다가 안전판을 찾아서 올라가게 되는데 이때 출발부터 안전판도달까지의 시간을 측정하고 이를 도달시간으로 하였다. 90초를 최대관찰 시간으로 하였고 만약 90 초 내에 안전판을 찾지 못하면 마우스를 안전판 위에 15초 동안 올려 놓았다. 1차 측정한지 1분 후, 2차 측정을 실시하였다. 각 데이터는 비디오 이미지 모션 분석기(video image motion analyzer, Ethovision, Noldus Information Technology)를 이용하여 분석하였다.

<134> 상기와 같이 각 마우스에 대한 수중미로측정을 오전 2회, 오후 2회씩 5일간 실시하였다. 각각의 실험을 3회 이상 독립적으로 실시하였으며, 분산분석법 또는 스튜던트 t-분석법을 이용하여 통계적 유의성을 검증하고 그 결과를 도 5에 나타내었다.

<135> 도 5에 나타난 바와 같이, CT105 단백질을 대뇌실에 주사한 마우스들의 도달시간은 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 더 많이 소요되었다. 이는 CT105 단백질의 침착으로 인해 치매가 유발되어 공간기억력이 감퇴되었기 때문이다.

<136> 그러나 본 발명의 조성물을 전처치한 후 CT105 단백질을 투여한 군에서는, CT105 단백질만을 투여한 군에 비해 도달시간이 유의하게 감소하였다.

## &lt;137&gt; 5) 결론

<138>       상기 수중미로측정을 통해, 본 발명의 조성물은 아밀로이드 전구단백질의 C단 부분 단백질에 의해 유발된 공간기억력의 감퇴를 예방하는 효과가 있음을 알 수 있다.

## 【발명의 효과】

<139>       본 발명의 조성물은 아밀로이드 베타 단백질 또는 C단 단백질의 독성에 의해 유발되는 뇌세포 사멸을 억제하는 효과가 있다.

<140>       또한 본 발명의 조성물은 아밀로이드 베타 단백질 또는 C단 단백질에 의해 유발되는 기억력의 감퇴를 회복시키는 효과가 있다.

<141>       따라서, 본 발명의 조성물은 상기의 증상들을 주증상으로 하는 알츠하이머성 치매를 한 각종 치매의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

미노사이클린을 유효성분으로 함유하는 치매 예방 및 치료용 약제학적 조성물

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 뇌세포 독성을 억제함을 특징으로 하는 약제학적 조성물

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 아밀로이드 베타 단백질의 뇌세포 독성을 억제함을 특징으로 하는 약제학적 조성물

【청구항 4】

제 2항에 있어서, C단 단백질의 뇌세포 독성을 억제함을 특징으로 하는 약제학적 조성물

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 기억력의 감퇴를 억제함을 특징으로 하는 약제학적 조성물

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유발되는 기억력의 감퇴를 억제함을 특징으로 하는 약제학적 조성물

**【청구항 7】**

제 5항에 있어서, C단 단백질에 의해 유발되는 기억력의 감퇴를 억제함을 특징으로 하는 억제학적 조성물

**【청구항 8】**

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 치매는 알츠하이머성 치매임을 특징으로 하는 억제학적 조성물

**【청구항 9】**

미노사이클린을 유효성분으로 함유하는 기억력 감퇴 예방 및 치료용 억제학적 조성물

**【청구항 10】**

제 9항에 있어서, 뇌세포 독성을 억제함을 특징으로 하는 억제학적 조성물

**【청구항 11】**

제 10항에 있어서, 아밀로이드 베타 단백질의 뇌세포 독성을 억제함을 특징으로 하는 억제학적 조성물

**【청구항 12】**

제 10항에 있어서, C단 단백질의 뇌세포 독성을 억제함을 특징으로 하는 억제학적 조성물

**【청구항 13】**

제 9항에 있어서, 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유발되는 기억력의 감퇴를 억제함을 특징으로 하는 억제학적 조성물

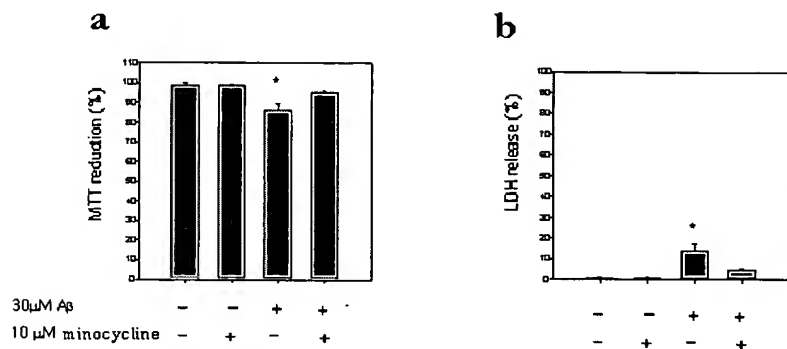
【청구항 14】

제 9항에 있어서, C단 단백질에 의해 유발되는 기억력의 감퇴를 억제함을  
특징으로 하는 약제학적 조성물

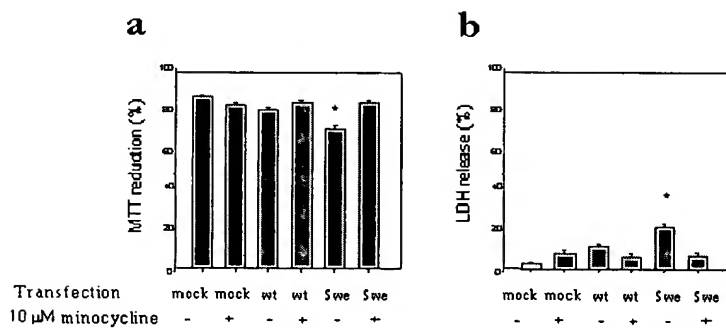


## 【도면】

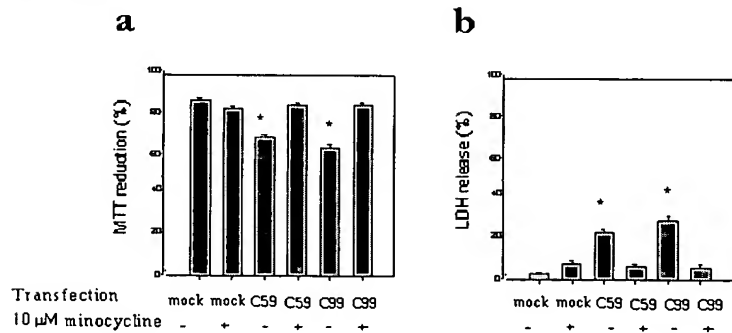
【도 1】



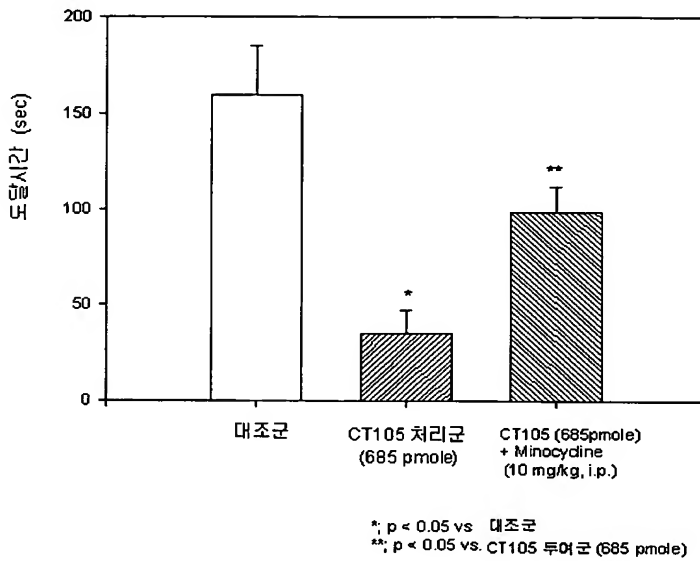
【도 2】



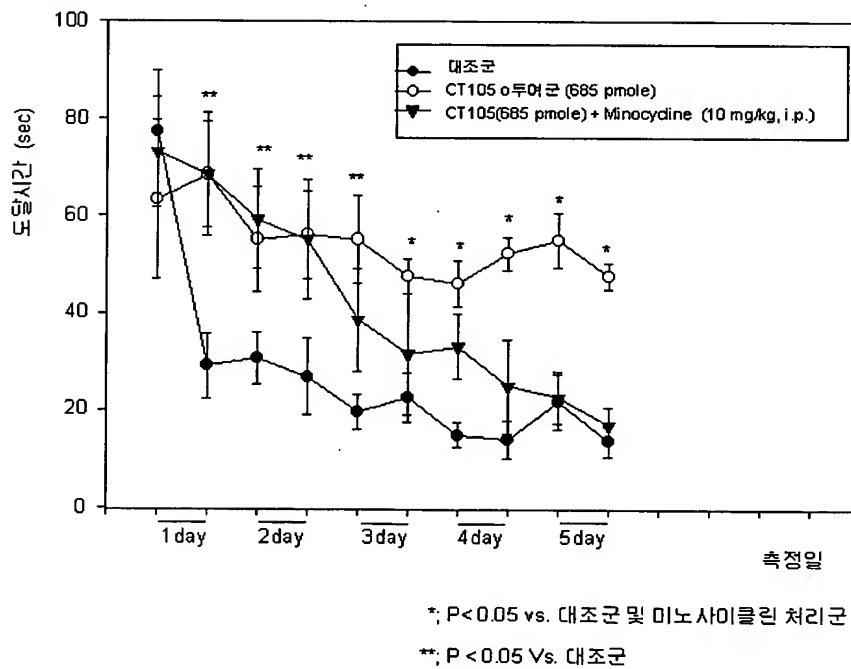
【도 3】



【도 4】



【도 5】



## 【서열목록】

<110> BRAINTROPIA Co., LTD. <120> Composition comprising  
 minocycline as an effective component for prevention and treatment  
 of dementia, and learning and memory impairment <130>

02P-302 <160>; 10 <170>; KopatentIn 1.71 <210>; 1  
 <211>; 26 <212>; DNA <213>; Artificial Sequence  
 <220>; <223>; forward primer for amplifying wild type gene of  
 amyloid precursor protein wild type <400>; 1 agtttcctcg  
 gcagcggtag gcgaga 26 <210>;  
 2 <211>; 27 <212>; DNA <213>; Artificial Sequence  
 <220>; <223>; reverse primer for amplifying wild type gene of  
 amyloid precursor protein wild type <400>; 2 gttctgcatc  
 tgctcaaaga acttgta 27 <210>;  
 3 <211>; 26 <212>; DNA <213>; Artificial Sequence  
 <220>; <223>; forward primer for amplifying swedish mutant form  
 of amyloid precursor protein wild type <400>; 3 agtttcctcg  
 gcagcggtag gcgaga 26 <210>;  
 4 <211>; 27 <212>; DNA <213>; Artificial Sequence  
 <220>; <223>; reverse primer for amplifying swedish mutant form  
 of amyloid precursor protein wild type <400>; 4 gttctgcatc  
 tgctcaaaga acttgta 27 <210>;  
 5 <211>; 27 <212>; DNA <213>; Artificial Sequence  
 <220>; <223>; forward primer for amplifying the gene coding C-  
 terminal 59 amino acids of amyloid precursor protein <400>;  
 5 atagcgacag tgatcgatcaccttg

27 <210> 6 <211> 27 <212> DNA <213>  
 Artificial Sequence <220> <223> reverse primer for amplifying  
 the gene coding C- terminal 59 amino acids of amyloid precursor  
 protein <400> 6 gttctgcatc tgctcaaaga acttgta

27 <210> 7 <211> 27 <212> DNA <213>  
 Artificial Sequence <220> <223> forward primer for amplifying  
 the gene coding C- terminal 99 amino acids of amyloid precursor  
 protein <400> 7 gatgcagaat tcggacatga ctgagga

27 <210> 8 <211> 27 <212> DNA <213>  
 Artificial Sequence <220> <223> reverse primer for amplifying  
 the gene coding C- terminal 99 amino acids of amyloid precursor  
 protein <400> 8 gttctgcatc tgctcaaaga acttgta

27 <210> 9 <211> 27 <212> DNA <213>  
 Artificial Sequence <220> <223> forward primer for amplifying  
 the gene coding C- terminal 105 amino acids of amyloid precursor  
 protein <400> 9 atctctgaag tgaagatgga tgcagaa

27 <210> 10 <211> 27 <212> DNA <213>  
 Artificial Sequence <220> <223> reverse primer for amplifying  
 the gene coding C- terminal 105 amino acids of amyloid precursor  
 protein <400> 10 gttctgcatc tgctcaaaga acttgta